

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-068138

(43)Date of publication of application : 26.04.1982

(51)Int.Cl.

B01J 20/22
C12N 9/00
G01N 31/08

(21)Application number : 55-141130

(71)Applicant : ORIENTAL YEAST CO LTD

(22)Date of filing : 11.10.1980

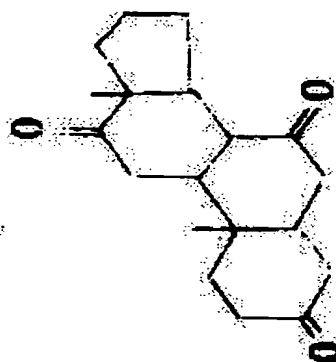
(72)Inventor : KOKAWARA ISAMU
FUJII KATSUMI
HORIO BUICHI

(54) CHROMATOGRAPHY ADSORBENT AND REFINING METHOD OF ENZYME USING THIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a chromatography adsorbent which is outstanding in refining effect when used for refining of enzyme, and by which enzyme of extremely high final purity is obtainable by fixing a specific hydrophobic group to a substrate.

CONSTITUTION: The hydrophobic group expressed by the formula is fixed to a substrate, by which the titled hydrophobic chromatography adsorbent is obtd. As said substrate, insoluble polysaccharides such as, for example, agarose gel in particular, are preferable. The ratio of said hydrophobic group per ml of the substrate is preferably 1W500•g equivalent. Further, steroid metabolic enzyme such as 3• hydroxysteroid-dehydrogenase in particular is enumerated as the enzyme to be refined by using this hydrophobic chromatography adsorbent.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

⑬ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭57—68138

⑤ Int. Cl.³
B 01 J 20/22
C 12 N 9/00
G 01 N 31/08

識別記号

1 3 3

庁内整理番号
7203—4G
7349—4B
6514—2G

④ 公開 昭和57年(1982)4月26日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ クロマトグラフィ吸着剤およびそれを用いた
酵素の精製法

⑮ 特 願 昭55—141130
⑯ 出 願 昭55(1980)10月11日
⑰ 発 明 者 高河原勇
川西市大和東5—7—13
⑱ 発 明 者 藤井克美

吹田市寿町1—14—6
⑲ 発 明 者 堀尾武一
高槻市大畑町2—7 摂津マンシ
ョンE—203
⑳ 出 願 人 オリエンタル酵母工業株式会社
東京都板橋区小豆沢3丁目6番
10号
㉑ 代 理 人 弁理士 相良省三

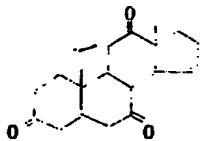
明細書の浄書(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

クロマトグラフィ吸着剤およびそれを用
いた酵素の精製法

2. 特許請求の範囲

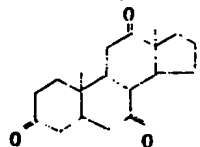
1.



基を支持体に固定して

なる吸着剤。

2.



基を支持体に固定して

なる吸着剤を用いる疎水性クロマトグラフィ
による酵素の精製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は吸着剤およびそれを用いた酵素の
精製法に関するものであり、更に詳しくは疎
水基を持つ吸着剤およびそれを用いた疎水性

クロマトグラフィによる酵素の精製法にある。

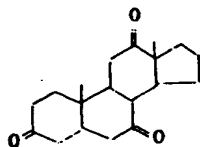
本発明にいう疎水性クロマトグラフィとは、
クロマトグラフィ吸着剤中に含まれる疎水基
と、蛋白質分子表面上の疎水基との間に生じ
る疎水結合を吸着力として利用するクロマト
グラフィの原理に基づくものであつて、最近
研究レベルで検討されるようになってきたが、
未だ実用例は比較的少ない。疎水基を有する
クロマトグラフィ吸着剤およびそれを用いる
酵素の精製法は、従来のイオン交換クロマト
グラフィなどの精製法と原理的に異なるため、
従来の精製法による精製が効果的でない場合
の精製に特に有効である。また高い塩濃度の
存在下でも酵素が吸着されるので、予備処理
としての脱塩処理が不要であるなどの長所を
もっている。

従来報告されている方法、例えば直鎖脂肪
族炭化水素を含有するクロマトグラフィ担体
を用いる疎水性クロマトグラフィによる酵素
の精製法には次の問題がある。

この疎水性クロマトグラフィは吸着が強すぎて、吸着された酵素を溶出するためには、高濃度の有機溶媒溶液を必要とするため、酵素の失活を引き起したり、それでもなを溶出が不十分でカラム内に吸着したまま残留するなどの欠点がある。他にもステロイドホルモンを固定化したクロマトグラフィ担体を利用して、アフィニティクロマトグラフィを試みた2, 3の例もあるが、クロマトグラフィ担体の原料となるホルモンは極めて高価であり、大規模な利用には不適當である。

本発明者らは、上記従来の欠点に鑑み鋭意研究の結果、新規なクロマトグラフィ吸着剤およびそれを用いた酵素の精製法を発明した。

即ち、本発明は

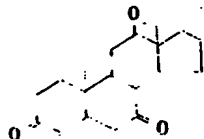


基を支

持体に固定してなる吸着剤、

支持体に固定せしめる方法としては、通常行われているカルボキシイミド法を用いることが出来る。

支持体に対する



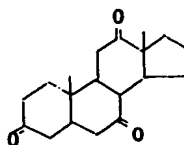
基の割合

は1μあたり1～500μg 当量が好ましい。

かくして得られた疎水性クロマトグラフィ吸着剤を用いて酵素の精製を行うわけであるが、本発明で精製し得る酵素は特に限定はなく、すべての酵素に適用される。なかでも特に3α-ヒドロキシステロイド-デヒドロゲナーゼ、β-ヒドロキシステロイド-デヒドロゲナーゼなどのステロイド代謝系酵素などの酵素精製に有用である。

本発明による疎水性クロマトグラフィ吸着剤を酵素の精製に使用する方法を例示すれば、次のような方法がある。

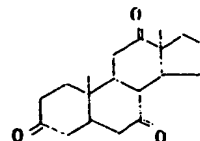
(a) 酵素の水溶液を吸着剤カラムに通塔し、



基を支持体に固定してなる

吸着剤を用いる疎水性クロマトグラフィによる酵素の精製法を提供するにある。

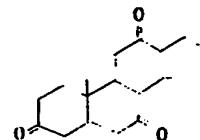
本発明でいう



基を固定

せしめる支持体としては、次のようなものが挙げられる。例えばアガロースゲル、デキスリンゲル、セルロース、多孔性ガラスビーズ、多孔性シリカゲル、多孔性合成樹脂などがあり、本発明においては特にアガロースゲルなどの水不溶性多糖類が好ましい。

本発明でいう



基を上記

吸着させた酵素をジメチルホルムアミド、エタナルアルコール、グリセリンなどの有機溶媒溶液によつて溶出させる。この時の有機溶媒濃度は、有機溶媒および酵素の種類によつて異なるが1～6% (V/V) の範囲が望ましい。

(b) カラムに吸着された酵素を、コール酸トライトンX-100(商品名)などの界面活性剤の水溶液によつて溶出させる。この時の界面活性剤の濃度は界面活性剤および酵素の種類によつて異なるが0.01～5% (W/V) の範囲が好ましい。

(c) NAD^+ , $NADP^+$ などの助酵素の存在下で酵素を吸着させ、助酵素の濃度を低くさせることによつて溶離する。この時の助酵素の濃度は、助酵素および酵素の種類によつて異なるが1～500μM の範囲が望ましい。

(d) 助酵素および有機溶媒の存在下で酵素を吸着させ、有機溶媒の存在下で助酵素の濃度を低下させることによつて、酵素を溶出させ

る、この時の助酵素および有機溶媒の好ましい濃度範囲は上記と同様である。

以下に本発明の実施例を示し詳述する。

実施例 1.

AH-セフアロース 4 B (ファルマシア社：商品名) 15 g を 0.5 M の NaCl 溶液で洗浄し、水分を尹過で除く。これに水 60 ml および 1 g のデヒドロコール酸を含むジオキサソ 120 ml を加えた後、pH を 4.5 ~ 6.0 に調整する。ゆつくり攪拌しながら、これに 1.5 g のカルボジイミド (ENC) (株式会社ペプチド研究所) を加えて、pH を 4.5 ~ 6.0 に保ちながら 24 時間攪拌を続ける。反応後、50 % (V/V) のジオキサソで洗浄し、更に水で洗浄した。以上の操作で約 40 ml の吸着剤 (デヒドロコール酸セフアロース) を得た。その基本的構造式を図 1-A に示す。

実施例 2

上記実施例 1 の吸着剤のカラム (10 ml) を 20 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) (以下

これを単に緩衝液とよぶ) で平衡化した後、1 mM の NADH を含む上記緩衝液 40 ml を流す。シュドモナス テマトステロンのヒドロキシステロイド-デヒドロゲナーゼ粗酵素 (シグマ社、グレード II) の溶液 (3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 20.9 U/ml、 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ 26.7 U/ml、蛋白質 21.1 mg/ml および 1 mM の NADH を含む上記緩衝液) 7 ml をカラムに流し、続いて 1 mM の NADH を含む上記緩衝液 100 ml で洗浄する。次に上記緩衝液 200 ml を流すことによつて、3 α -ヒドロキシステロイド-デヒドロゲナーゼ (3 α -酵素) を溶出させた (図 2 の 1)。

次に 5 % ジメチルホルムアミドおよび 1 mM の NAD⁺ を含む上記緩衝液 100 ml でカラムを洗浄し、続いて 5 % ジメチルホルムアミドを含む上記緩衝液 200 ml によつて β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (β -酵素) を溶出させた (図 2 の 2)。

この結果、3 α -酵素の回収率は約 67 %、ピークの比活性は 310 U/mg 蛋白質 (310 倍精製) であつた。また、 β -酵素の回収率は約 61 %、ピークの比活性は 61 U/mg (4.7 倍精製) であつた。

尚、図 1-B に示すような酢酸セフアロースのカラムを用いて同様のクロマトグラフィーを試みた場合には、いずれの酵素もカラムに全く吸着されなかつた。

Battais らが行つたエステロンアミノカプロン酸アガロースを吸着剤として用いるアフィニティクロマトグラフィーによると、上記と同様の酵素試料の精製結果では、3 α -酵素は比活性 13.3 U/mg 蛋白質から 86.5 U/mg 蛋白質へ 6.5 倍の精製であり、回収率は 68 % であつた。また、 β -酵素は 0.26 U/mg 蛋白質から 3.33 U/mg 蛋白質へ 12.8 倍の精製であり、回収率は 69 % であつた。

本発明の実施例による結果は上記従来法と比較して回収率では大差ないが、精製効果お

よび最終純度が極めて優れている。

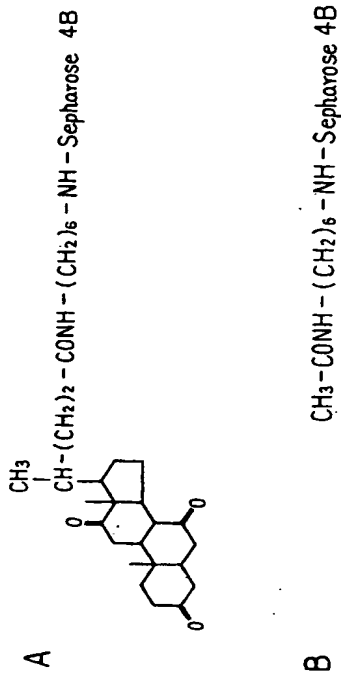
4. 図面の簡単な説明

図中、第 1 図は構造式を示すものであり、A は本発明の吸着剤 (デヒドロコール酸セフアロース)、B は従来法の吸着剤 (酢酸セフアロース) である。

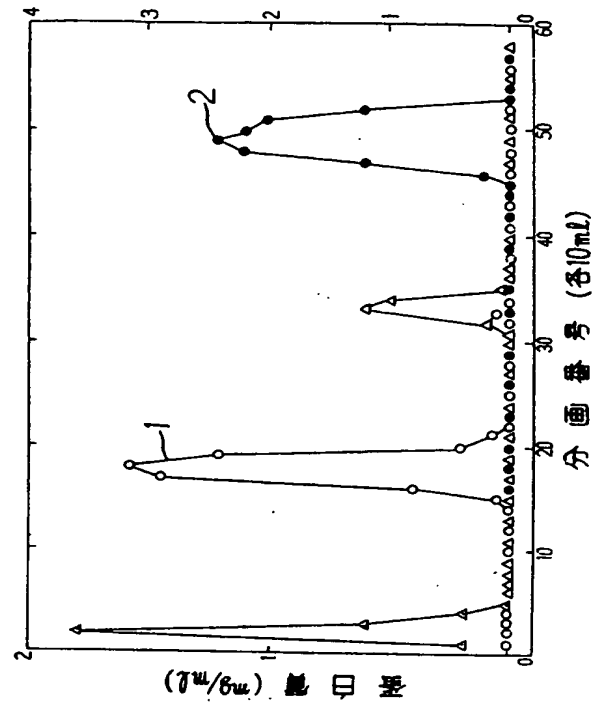
第 2 図は、本発明の疎水性クロマトグラフィー分画を示すもので、1 は 3 α -酵素、2 は β -酵素である。

図面の浄書(内容に変更なし)

第1図



第2図



手続補正書(自発)

昭和55年12月16日

特許庁長官 島田 春樹 殿

1 事件の表示

特願昭55-141130号

2 発明の名称

クロマトグラフィー吸着剤およびそれを用いた
酵素の精製法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 オリエンタル酵母工業株式会社

4 代理人

住所 東京都港区西新橋1-8-8 中銀虎ノ門ビル

氏名 (6178)弁理士 相良 省三

5 補正の対象

明細書、図面及び委任状

6 補正の内容

正式な明細書、図面及び委任状を別紙のとおり補充する。

